

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. August 2005 (25.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/077978 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 16/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/001371

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. Februar 2005 (11.02.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 007 462.3
13. Februar 2004 (13.02.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜS-
SELDORF** [DE/DE]; Universitätsstrasse 1, 40225
Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KORTH, Carsten**
[DE/DE]; Fürstenwall 57, 40219 Düsseldorf (DE). **LE-
LIVELD, Rutger, S.** [NL/DE]; Bilker Allee 126, 40217
Düsseldorf (DE).

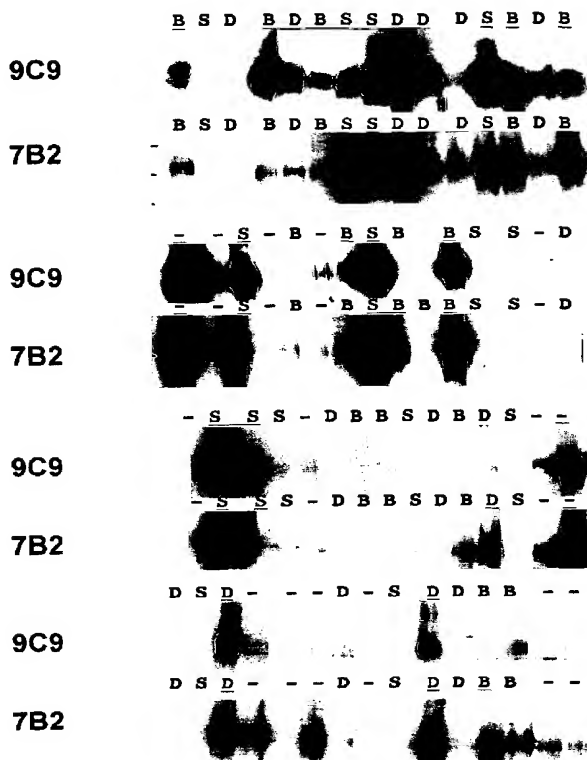
(74) Anwalt: **EMMEL, Thomas**; Schaefer Emmel Hausfeld,
Gehölzweg 20, 22043 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: ANTIBODY FOR DIAGNOSING AND TREATING NEUROPSYCHIATRIC DISEASES, IN PARTICULAR
SCHIZOPHRENIA, DEPRESSION AND BIPOLAR AFFECTIVE DISORDERS

(54) Bezeichnung: ANTIKÖRPER ZUR DIAGNOSE UND BEHANDLUNG VON NEUROPSYCHIATRISCHEN ERKRAN-
KUNGEN, INSBESONDERE VON SCHIZOPHRENIE, DEPRESSION UND BIPOLAREN AFFEKTIVEN STÖRUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to an antibody for diagnosing or treating neuropsychiatric diseases, in particular schizophrenia, depression or bipolar affective diseases. The invention is characterised in that the antibody recognises misfolded, specific proteins that can be associated with one of the diseases. The invention also relates to a method for diagnosis using antibodies that bond to proteins specific to neuropsychiatric diseases.

(57) Zusammenfassung: Ein Antikörper für die Diagnose oder die Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen, insbesondere von Schizophrenie, Depression oder bipolaren affektiven Erkrankungen, ist dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper fehlgefaltete, spezifische Proteine erkennt, die sich einer der Erkrankungen zuordnen lassen sowie eine Verfahren zur Diagnose mittels Antikörpern, die an für neuropsychiatrische Erkrankungen spezifische Proteine binden.

WO 2005/077978 A2



TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Antikörper zur Diagnose und Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen, insbesondere von Schizophrenie, Depression und bipolaren affektiven Störungen.

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper zur Diagnose und Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen. Im wesentlichen richtet sich die Erfindung auf neuropsychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie, Depression oder bipolare affektive Störungen. Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung wird im wesentlichen auf Schizophrenie eingegangen werden. Das hierfür gesagte gilt aber grundsätzlich auch für andere neuropsychiatrische Erkrankungen.

Die Schizophrenie ist eine neuropsychiatrische Erkrankung, die wahrscheinlich heterogene Ursachen hat. Aufgrund von Zwillingsstudien ist inzwischen anerkannt, daß biologische Ursachen für die Entstehung der Schizophrenie verantwortlich sind. Neuropathologisch findet sich bei Patienten mit Schizophrenie eine Erweiterung des dritten Hirnventrikels, was als unspezifisches Zeichen für einen Hirnstrukturverlust gewertet wird. Die Schizophrenie, zumindest eine Untergruppe der Schizophrenie, nämlich solche mit ausgeprägten sogenannten Negativsymptomen, kann den neurodegenerativen Erkrankungen zugeordnet werden (J. Lieberman 1999, Biological Psychiatry 46: 729f).

Es gibt bislang keine biologische Diagnostik der Schizophrenie oder anderer neuropsychiatrischer Erkrankungen. Zur Diagnosestellung werden von entsprechend ausgebildeten Ärzten (Psychiater, Nervenärzte) bestimmte psychiatrische Kardi-

nalsymptome erfragt; dies kann durch sogenannte Checklisten objektiviert werden. Anders als bei internistischen oder neurologischen Krankheiten kann die Krankheit nicht mit Hilfe von eindeutigen Blut- oder Liquoruntersuchungen oder bildgebenden Verfahren diagnostiziert werden. Dies führt zu einer Unsicherheit in der Diagnostik.

Aus der WO 0026675 ist ein gattungsgemäßes Verfahren zur Diagnose von neuropsychiatrischen Erkrankungen bekannt, bei dem die Anwesenheit von Polyglutamin-haltigen Proteinen in einer Gewebe- oder Körperflüssigkeitsprobe eines Patienten mit Hilfe eines gegen Polyglutamin-haltige Proteindomänen gerichteten Antikörpers getestet wird. Die WO 0026675 führt weiter aus, daß es sich bei den mit diesem Verfahren zu diagnostizierenden neuropsychiatrischen Erkrankungen um Schizophrenie handeln kann.

Polyglutamin-haltige Proteine treten bei einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen auf, so z.B. bei der Huntington'schen Krankheit oder bei spinocerebellären Ataxien. Diese Krankheiten zeichnen sich durch ein mutationsbedingtes erhöhtes Auftreten von sich wiederholenden Glutaminresten in einem oder mehreren Proteinen aus und werden auch als CAG-Repeat-Erkrankungen zusammengefaßt, da das DNA-Triplett CAG für Glutamin codiert.

Dabei führt z.B. bei der Huntington'schen Krankheit eine Mutation im humanen HD-Gen zu einer Erhöhung der Anzahl an Glutaminresten am N-Terminus des Proteins Huntingtin. Das mutante, Polyglutamin-reiche Huntingtin neigt aufgrund seiner fehlerhaften Aminosäuresequenz zur Aggregation mit anderen Polyglutamin-reichen Huntingtin-Molekülen. Dabei bilden sich im Zellkern von Neuronen Agglomerate, die mit dem tödlichen Verlauf der Krankheit einhergehen. Für das Entstehen krankheitsspezifischer Symptome anderer Polyglutamin-

Erkrankungen werden ähnliche sequenzbedingte Proteinaggregationen verantwortlich gemacht.

Das aus der WO 0026675 bekannte Verfahren bedient sich eines gegen Polyglutamin-haltige Proteindomänen gerichteten monoklonalen Antikörpers (1C2) und ist daher nicht spezifisch für Schizophrenie. Das Verfahren eignet sich lediglich zum Nachweis von Polyglutamin-haltigen Proteinen. Es bestehen jedoch Zweifel, ob Schizophrenie überhaupt mit dem Auftreten von Polyglutamin-haltigen Proteinen einhergeht. Auf diese Zweifel wird weiter unten ausführlich eingegangen.

Unter der in der WO 0026675 postulierten, allerdings jedoch nicht zutreffenden Prämisse, dass Schizophrenie mit dem Vorhandensein von Polyglutamin-haltigen Proteinen einhergeht, könnte das bekannte Verfahren folglich helfen, einen aufgrund einer psychiatrischen Diagnose gehegten Verdacht auf Schizophrenie zu untermauern. Eine Diagnose der Schizophrenie allein mit diesem Verfahren ist dagegen nicht möglich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Antikörper für die Diagnose oder die Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen, insbesondere von Schizophrenie, Depression oder bipolaren affektiven Störungen zur Verfügung zu stellen. Weitere Aufgabe ist es, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem die erwähnten neuropsychiatrischen Erkrankungen, insbesondere die Schizophrenie, sicher und eindeutig diagnostiziert werden können. Schließlich ist es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung von z.B. Schizophrenie zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgaben werden mit den Merkmalen der vorliegenden Ansprüche 1, 22, 26, 28 und 31 gelöst.

Erfindungsgemäß ist ein Antikörper vorgesehen, der grundsätzlich fehlgefaltete Proteine erkennt, die sich einer neuropsychiatrischen Erkrankung zuordnen lassen. Bevorzugt handelt es sich um Antikörper, die fehlgefaltete Proteine erkennen, die spezifisch für Schizophrenie, Depression oder bipolare affektive Störungen sind.

Im Rahmen der Erfindung soll der Begriff neuropsychiatrische Erkrankung insbesondere Psychosen, einschließlich organischer Psychosen, d.h. Erkrankungen, die als Symptom klassische Psychosemerkmale aufweisen (Wahn, Halluzinationen, Gedankenbeeinflussung, Verstimmungen, oder andere affektive Symptome und kognitive Störungen) abdecken. Besonders bevorzugt handelt es sich um Schizophrenie, Depression und bipolare Störungen.

Denkbar ist in einer weiteren Ausgestaltung auch, dass ein erfindungsgemäßer Antikörper fehlgefaltete Proteine erkennt, die für mehrere neuropsychiatrische Erkrankungen spezifisch sind, wobei die Zuordnung zu einer Erkrankung anhand von weiteren Eigenschaften des Proteins, z.B. seiner Löslichkeit oder seines Molekulargewichts oder aber auch anhand der Herkunft des Proteins aus z.B. einer bestimmten Hirnregion möglich ist.

In einer bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, dass der erfindungsgemäße Antikörper durch Immunisierung von geeigneten Tieren mit aufgereinigten Hirnfraktionen von Patienten gewonnen wird, die an einer neuropsychiatrischen Erkrankung leiden, wobei während der Aufreinigung Schritte vorgesehen sind, die eine Anreicherung von fehlgefalteten Proteinen bewirken.

Um den erfindungsgemäßen Antikörper näher zu erläutern, muß zunächst noch einmal auf die bereits erwähnten Polyglutamin-Erkrankungen zurückgekommen werden. Da diese wie oben geschildert auf eine Mutation in einem Gen zurück-

gehen, ist die Prädisposition für diese Erkrankungen in der Regel erblich. Sie werden daher auch unter dem Begriff "hereditäre neurodegenerative Erkrankungen" zusammengefaßt. Es ist jedoch umstritten, ob es sich z.B. bei Schizophrenie überhaupt um eine Polyglutamin-Erkrankung handelt, da bislang im Gegensatz zur Huntington'schen Krankheit kein Polyglutamin-haltiges Protein identifiziert werden konnte, das mit der Entstehung der Schizophrenie in Verbindung gebracht werden oder bei Schizophrenie-Patienten in anomalen Konzentrationen nachgewiesen werden kann.

Polyglutaminerkrankungen sind überdies seltene Erkrankungen. Im Verhältnis zur Huntington'schen Krankheit treten neurodegenerative Erkrankungen, die nicht mit Polyglutamin korreliert sind, wesentlich häufiger auf, die Alzheimer'sche Erkrankung z.B. 150 mal, die Parkinson'sche Krankheit 30 mal und die Schizophrenie 100 mal häufiger (S. Prusiner 2001, New England Journal of Medicine 344: 1516f).

Zwar ist anerkannt, daß es eine genetische Disposition für Schizophrenie gibt, jedoch scheinen die Ursachen multifaktoriell zu sein. Hierfür spricht, daß selbst der eineiige Zwilling eines an Schizophrenie erkrankten Patienten nur ein 50-%iges Risiko hat, ebenfalls an Schizophrenie zu erkranken (I. Gottesman and J. Shields 1982, Schizophrenia: the epigenetic puzzle, Cambridge University Press, Cambridge; Kendler et al 1993, The Roscommon Family Study. I. Methods, diagnosis of probands, and risk of schizophrenia in relatives, Arch Gen Psychiatry 50 (7): 527).

Die Erfinder haben nun erstmals Hinweise dafür gefunden, daß das Vorhandensein von fehlgefalteten Proteinen als diagnostischer Marker für Schizophrenie oder andere neuropsychiatrische Erkrankungen, wie z.B. Depression oder bipolare affektive Störungen dienen kann. Dabei wurde postuliert, daß die Fehlfaltung

auf posttranslationale Ursachen zurückzuführen ist und nicht – oder nur zu einem geringen Teil - mit sequenzbedingten Anomalien wie CAG-Repeats in Verbindung gebracht werden kann. Verantwortlich für die Fehlfaltung kann z.B. ein Fehler während der Proteinbiosynthese oder Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum sein, der z.B. durch fehlerhafte Prozessierungsenzyme wie z.B. Transloconkomponenten oder Chaperone verursacht werden kann. Ebenso ist denkbar, daß Reparaturenzyme oder Proteasen, die bereits fehlgefaltete Proteine reparieren bzw. verdauen sollen, fehlerhafte Funktionen aufweisen. Es ist auch denkbar, daß bestimmte Enzyme der posttranslationalen Verarbeitung oder Proteasen ein zunächst richtig gefaltetes Protein fehlerhaft derart modifizieren, dass es übermässig in einer fehlerhaften Faltung produziert wird.

Die Fehlfunktionen der Prozessierungsenzyme, Reparaturenzyme und/oder Proteasen können dabei gegebenenfalls durch Mutationen in den jeweiligen Genen oder deren Interaktionspartner auf Proteinebene verursacht sein, was eine eventuelle familiäre Disposition für Schizophrenie erklären könnte. Als mögliche Kandidaten sind dabei die Gene für die Proteine DISC-1, Dysbindin, Neuregulin 1, COMT, RGS4, der metabotrope Glutamatrezeptor-3, DAAO, and G72 im Gespräch (P. Harrison & M. Owen 2003, Lancet 361:417f; P. Harrison and D. R. Weinberger 2005, Molecular Psychiatry 10:40-68).

Erfindungsgemäß werden die Hirnfraktionen von z.B. Schizophreniepatienten gezielt aufgereinigt, um die posttranslational fehlgefalteten Proteine zu isolieren und anzureichern. In einer bevorzugten Ausgestaltung können mit den aufgereinigten Fraktionen in herkömmlicher Weise geeignete Tiere (Kaninchen, Mäuse, Schafe, Hühner) immunisiert und so Antikörper gewonnen werden, die spezifisch an diese Proteine binden.

Anstelle einer Immunisierung ist es möglich, mit rekombinanten Liganden- oder Antikörperbibliotheken, die z.B. in Phagen exprimiert werden, geeignete Antikörper oder deren Fragmente zu identifizieren, die spezifisch an die aufgereinigten, fehlgefalteten Proteine binden, und die nach Identifizierung durch Mutagenese *in vitro* affinitäts-maturiert werden können.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung ist dabei vorgesehen, dass der Aufreinigung ein Reinigungsschritt mit ionischen Detergenzien ist. Die Aufreinigung der Hirnfraktionen mit ionischen Detergenzien dient dazu, leicht denaturierbare Proteine in der aufzureinigenden Probe aufzulösen. Fehlgefaltete Proteine, die zur Aggregation neigen, werden dagegen durch ionische Detergenzien insbesondere bei Temperaturen zwischen 0 und 10 Grad Celsius nicht denaturiert, verbleiben daher nicht in Lösung, pelletieren also unter (Ultra-) Zentrifugationsbedingungen und können so in nativer Form für die Immunisierung isoliert werden.

Um auszuschließen, daß es sich bei den schizophreniespezifischen Proteinen um Polyglutamin-haltige Proteine handelt, hat der Anmelder erfindungsgemäß isolierte Hirnfraktionen von Schizophreniepatienten sowie gesunden Testpersonen einem Western Blot mit dem markierten Antikörper MW1 unterzogen. Dieser Antikörper erkennt ähnlich wie der in der WO 0026675 verwendete Antikörper 1C2 Polyglutamin-reiche Epitope in Proteinen bzw. Polyglutamin-Polymere. In diesen Versuchen stellte sich heraus, daß sowohl in den Hirnfraktionen von Schizophreniepatienten als auch in denen gesunder Testpersonen Polyglutamin-haltige Proteine nachweisbar waren. Es waren jedoch keine Unterschiede im Polyglutamin-Gehalt feststellbar. Die Ergebnisse werden weiter unten besprochen. Der Anmelder hat daraus gefolgert, daß Polyglutamin-haltige Proteine bei Schizophreniepatienten nicht in erhöhter Konzentration auftreten und daher nicht als diagnostische Marker für Schizophrenie verwendet werden können.

Wie bereits erläutert, dient die Aufreinigung der Hirnfraktionen mit ionischen Detergenzien dazu, mißgefaltete Proteine, die durch diese Detergenzien nicht denaturiert werden, zu isolieren. In einer bevorzugten Ausgestaltung ist überdies vorgesehen, dass der Reinigungsschritt bei 0 - 10 °C durchgeführt wird, da die mißgefalteten Proteine bei höheren Temperaturen auch durch ionische Detergenzien denaturiert werden können. Besonders bevorzugt wird bei diesem Reinigungsschritt eine Temperatur von bei 0 - 5°C verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass das während des Reinigungsschritts verwendete ionische Detergens in einer Konzentration zwischen 0.2 und 2 % eingesetzt wird. Auch diese Maßnahme dient dazu, eine Denaturierung der mißgefalteten Proteine zu verhindern, da diese bei höheren Konzentrationen auch durch ionische Detergenzien denaturiert werden können. Bevorzugt wird bei diesem Reinigungsschritt eine Konzentration verwendet, bei der gewährleistet ist, daß das Detergens noch keine Mizellen ausbildet ("critical micellar concentration", CMC).

Unterhalb der CMC binden Detergensmoleküle an Proteine, während sie oberhalb der CMC Mizellen ausbilden. Eine Konzentration unterhalb der CMC ist für die Aufreinigung von fehlgefalteten Proteinen günstiger, da dann vermehrt Detergens an unerwünschte Proteine bindet und diese im Gegensatz zu den fehlgefalteten Proteinen in Lösung bringt. Die CMC unterscheidet sich von Detergens zu Detergens. Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass die CMC auch vom pH-Wert und der Temperatur des Mediums abhängt. Bevorzugt wird bei diesem Reinigungsschritt eine Konzentration zwischen 0.2 und 1 % verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, dass das während des Reinigungsschritts verwendete ionische Detergens Sarkosyl ist. Sarkosyl wird deswegen bevorzugt verwendet, da dies ermöglicht, einerseits genügend uner-

wünschte, korrekt gefaltete Proteine zu denaturieren, andererseits aber die Mikroaggregate der fehlgefalteten Proteine zu erhalten. Diese Aggregations-/Löslichkeitsbalance hängt von der CMC eines Detergens ab.

Das Detergens Sodium dodecyl sulfat (SDS) wirkt dagegen beispielsweise zu stark denaturierend und ist daher für den genannten Zweck weniger geeignet.

Besonders bevorzugt wird Sarkosyl in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.3 und 0.42 % verwendet. Unter Normalbedingungen erreicht Sarkosyl bei 0.45 % seine CMC.

Während des Reinigungsschritts wird besonders bevorzugt ein Ultrazentrifugationsschritt bei mindestens 100 000 x g eingesetzt. Da die fehlgefalteten Proteine unter den erwähnten Bedingungen nicht löslich sind, finden sie sich nach der Ultrazentrifugation im Pellet, während andere Proteine im Überstand bleiben.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, daß während der Aufreinigung ein Reinigungsschritt mit β -Faltblatt-bindenden Substanzen wie Kongorot, Thioflavin oder β -Faltblatt-bindenden Peptiden vorgesehen. Diese Substanzen können ggf. in einer Chromatographie-Säule ö.ä. immobilisiert sein. Da die Sekundärstruktur der fehlgefalteten, schizophreniespezifischen Proteine einen erhöhten Anteil an β -Faltblatt-Domänen ("betasheet") aufweist, können die gesuchten Proteine auf diese Weise gezielt angereichert werden.

Ebenso ist bevorzugt vorgesehen, dass während der Aufreinigung ein Protease-Verdauungsschritt bei einer Temperatur von 0 – 10 °C vorgesehen ist. Dieser Schritt eignet sich ebenso zur Anreicherung von fehlgefalteten, schizophreniespezifischen Proteinen, da diese aufgrund ihrer Fehlfaltung unter kalten Bedingungen eine erhöhte Resistenz gegen Proteasen wie z.B. Proteinase K aufweisen,

während nicht fehlgefaltete Proteine bei diesen Temperaturen durch Proteasen verdaut werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, dass der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist. Für die Gewinnung monoklonaler Antikörper wird zunächst ein geeignetes Tier immunisiert, und dann in bekannter Weise antikörperproduzierende Zellen (z.B. B-Zellen der Milz) aus dem immunisierten Tier entnommen, mit immortalisierten Myelomzellen fusioniert und selektioniert. Die erhaltenen Hybridomazellen werden dann in Hinblick auf die Spezifität der von Ihnen produzierten Antikörper gegen das fehlgefaltete Protein ausgewählt. Anstelle einer Immunisierung ist es möglich, mit rekombinanten Liganden- oder Antikörperbibliotheken, die z.B. in Phagen exprimiert werden, geeignete Antikörper zuzidentifizieren, die spezifisch an die aufgereinigten, fehlgefalteten Proteine binden, und die nach Identifizierung durch Mutagenese *in vitro* affinitäts-maturiert werden können.

Insbesondere können im Rahmen der Erfindung monoklonale Antikörper zum Einsatz kommen, die die Bezeichnungen 7B2 und 9C9 tragen. Hybridomazellen, mit denen die Antikörper produziert werden können wurden unter den Nummern DSM ACC2713 und DSM ACC2714 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

Monoklonale Antikörper ermöglichen eine höhere Spezifität der immunochemischen Nachweisreaktion und verbessern damit die Genauigkeit z.B. eines Nachweisverfahrens. Besonders bevorzugt ist dabei vorgesehen, daß der Antikörper ein konformations-spezifischer monoklonaler Antikörper ist, ein Antikörper also, der ein Epitop eines gegebenen Proteins nur in einer bestimmten Konformation erkennt, z.B. ausschließlich dann, wenn das Epitop in einer β -Faltblatt-Konformation vorliegt.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, daß der Antikörper ein rekombinanter Antikörper ist. Für die Gewinnung eines solchen Antikörpers wird z.B. aus den Milzzellen immunisierter Tiere DNA isoliert und daraufhin die Paratop-kodierenden cDNA-Fragmente kloniert.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, dass der Antikörper ein hirngängiger Antikörper ist. Unter dem Begriff "hirngängig" wird verstanden, daß die Antikörper die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Dabei sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, die Blut-Hirn-Schranke für die Antikörper passierbar zu machen, etwa durch gleichzeitige Gabe geeigneter Pharmazeutika oder hypertonischer Zuckerlösungen. Andererseits können die Antikörper auch durch molekularbiologische Modifikationen in die Lage versetzt werden, die Blut-Hirn Schranke passieren zu können, z.B. in dem ihre Hydrophobizität erhöht oder ihr Molekulargewicht erniedrigt wird oder die Antikörper mit einer Signalsequenz markiert werden, die deren gezielten Transport über die Blut-Hirn-Schranke fördert.

Monoklonale Antikörper weisen eine sehr viel höhere Spezifität auf als polyklonale Antikörper, bergen aber im therapeutischen Einsatz ebenso wie erstere die Gefahr von Abstoßungsreaktionen. In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist daher vorgesehen, dass der Antikörper ein chimärer oder ein humanisierter Antikörper ist. Bei chimären Antikörpern werden auf molekularbiologischem Wege die konstanten Domänen z.B. von Mausantikörpern durch die entsprechenden konstanten Domänen menschlicher Antikörper ersetzt. Zusätzlich werden bei humanisierten Antikörpern auch die Grundgerüste der variablen Domäne durch entsprechende menschliche Sequenzen ersetzt, so daß nur die für die Antigenbindung verantwortlichen hypervariablen Regionen weiterhin murinen Ursprungs sind. Solchermaßen modifizierte Antikörper verursachen bei der Applikation im Patienten nur sehr geringe und in der Regel tolerierbare Abstoßungsreaktionen.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, dass der Antikörper ein Antikörperfragment ist. Hierbei kann es sich zum Beispiel um monovalente F(ab)-Fragmente handeln, wie sie z.B. nach Papain-Verdau von IgG-Antikörpermolekülen gewonnen werden, oder um bivalente F(ab)₂-Fragmente, wie sie z.B. nach Trypsin-Verdau gewonnen werden. Antikörperfragmente lassen sich leichter in chimäre Antikörper klonieren oder mit humanisierten oder humanen Sequenzen bzw. mit Signalsequenzen kombinieren. Außerdem verursachen Antikörperfragmente eine schwächere Abstoßungsreaktion.

In einer weiteren Ausgestaltung kann vorgesehen sein, dass die erfindungsgemäßen Antikörper an eine pharmazeutisch aktive Substanz und/oder gemäß noch einer weiteren Ausgestaltung an ein Isotop oder ein radioaktiv markiertes Molekül gekoppelt sind. Die letztgenannten Antikörper könnten z.B., bei der Radioimmuntherapie oder der nuklearmedizinischen Diagnostik Anwendung finden.

Weiterhin ist ein Verfahren zur Diagnose von z.B. Schizophrenie oder Depression oder bipolaren affektiven Störungen mittels Antikörpern, die an für neuropsychiatrische Erkrankungen spezifische Proteine binden, vorgesehen. Dabei werden die Antikörper mit einer Gewebe- oder Körperflüssigkeitsprobe eines Patienten in Kontakt gebracht und gegebenenfalls gebildete Antikörper-Proteinkomplexe nachgewiesen. Das eventuelle Vorhandensein von Antikörper-Proteinkomplexen wird dabei als positiver Befund für Schizophrenie, Depression, oder Bipolare affektive Erkrankung gewertet. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass einer der zuvor beanspruchten Antikörper verwendet wird.

Dabei hat sich herausgestellt, daß die von dem Anmelder erfindungsgemäß hergestellten Antikörper spezifisch an z.B. schizophrenietypische Proteine binden. Um dies zu belegen, hat der Anmelder immunochemische Vergleichsversuche

mit Hirnhomogenaten gesunder und schizophreniekranker Testpersonen durchgeführt. Dabei wurden Hirnfraktionen von Schizophreniepatienten sowie gesunden Testpersonen einem Western Blot mit den erfindungsgemäß gewonnenen Antikörpern unterzogen. Im Ergebnis fand der Anmelder immunoreaktive Banden, die nur in den Hirnfraktionen von Schizophreniepatienten nachweisbar waren. Die erfindungsgemäß gewonnenen Antikörper erkennen also Proteine, die nur bei Schizophreniepatienten auftreten. Die Ergebnisse werden weiter unten besprochen.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, dass das Vorhandensein von Antikörper-Proteinkomplexen mittels ELISA, Western-Blot oder immungekoppelter Fluoreszenzmethoden nachgewiesen wird. Es ist jedoch auch jedes andere geeignete Verfahren, mit dem die Bindung von Antikörpern bzw. anderen Sondenmolekülen an Antigene nachgewiesen werden kann, denkbar.

Da fehlgefaltete Proteine bei neuropsychiatrischen Erkrankungen, insbesondere Schizophrenie, aber auch Depression oder der bipolaren affektiven Erkrankung vermutlich schon lange vor Ausbruch der Krankheit in Gewebe- oder Körperflüssigkeitsproben eines Patienten nachweisbar sind, eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren auch dazu, eine gegebenenfalls vorhandene Disposition für die jeweilige neuropsychiatrische Erkrankung, also für Schizophrenie, aber auch Depression oder der bipolaren affektiven Erkrankung nachzuweisen. In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist daher vorgesehen, dass der positive Befund eine diagnostizierte Prädisposition und/oder eine positive Diagnose für die spezifische neuropsychiatrische Erkrankung, im speziellen also der Schizophrenie oder eine Untergruppe der Schizophrenie, bzw. der Depression oder bipolar affektiven Erkrankung ist.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass die zu untersuchende Körperflüssigkeitsprobe Liquor, Urin, Blut oder Serum ist. Es ist davon auszugehen, daß z.B. bei einem Patienten mit Verdacht auf Schizophrenie, aber auch solchen mit Verdacht auf Depression oder eine bipolar affektive Erkrankung krankheitsspezifische fehlgefaltete Proteine außer in der Hirnmatrix auch in Körperflüssigkeiten vorkommen. Dies gilt insbesondere für den Liquor (Spinalflüssigkeit), der in ständiger Verbindung mit dem Gehirn steht, und von dem in der klinischen Routine durch Punktion des Rückenmarkskanals gefahr- und schmerzlos Proben genommen werden können.

Die vorliegende Erfindung beschränkt sich jedoch nicht nur auf ein Verfahren zur Diagnose von Schizophrenie, einer Depression oder einer bipolaren affektiven Störungen, sondern erstreckt sich auch auf die Verwendung z.B. der erfindungsgemäßen Antikörper bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung dieser Erkrankungen.

Es handelt sich dabei um Zusammensetzungen, die einem Patienten insbesondere in hirngängiger Form appliziert werden können. Insbesondere werden die zuvor beanspruchten Antikörper verwendet mit dem Zweck, dass die ins Gehirn gelangten Antikörper dort an z.B. schizophrenie-spezifische, fehlgefaltete Proteine binden und z.B. deren Aggregation mit anderen fehlgefalteten Proteinen verhindern.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, dass die applizierten Antikörper mit pharmazeutisch aktiven Substanzen gekoppelt sind. Bei diesen Substanzen kann es sich z.B. um Marker handeln, die das vom Antikörper gebundene Protein dergestalt markieren, daß es von einer Protease verdaut oder von einer Mikrogliazelle phagozytiert wird. Es kann sich dabei aber auch um Substanzen handeln, die die von den Antikörpern markierten Proteine für bildgeben-

de Verfahren (NMR, CT) sichtbar machen. Denkbar ist auch, dass mit radioaktiv markierten Substanzen gekoppelte Antikörper eingesetzt werden.

Ein andere Variante sieht die Herstellung von Zusammensetzungen unter Verwendung niedermolekularer, hirngängiger Agentien vor, die die gleichen Stellen erkennen wie die gegen fehlgefaltete, schizophrenie-spezifische Proteine gerichteten zuvor beanspruchten Antikörper. Die zuvor beanspruchten Antikörper dienen dabei als Vorlage um eine Oberflächenstruktur auf den fehlgefalteten Proteinen zu definieren, für die dann mit Hilfe gängiger Verfahren, die unter "Molecular Design" zusammengefasst werden, niedermolekularen Agentien in chemischen Bibliotheken zu identifizieren, die mindestens eine ähnliche Oberflächenstruktur wie der verwendete Antikörper auf dem fehlgefalteten Protein abbilden. Bei den Antikörpern kann es sich zum Beispiel um durch Klonierung gewonnene Moleküle handeln, deren cDNA in einer molekularbiologischen Library humaner Antikörper oder Peptide identifiziert wurde.

Bevorzugt handelt es sich bei diesen niedermolekularen Agentien um organische Moleküle, die spezifisch an die von einem der zuvor beanspruchten Antikörper erkannten Epitope schizophrenie-spezifischer Proteine binden. Solche Agentien werden auch als "small molecular drugs" bezeichnet. Es kann sich dabei sowohl um Naturstoffe als auch um synthetisch hergestellte Moleküle handeln. Small molecular drugs bieten gegenüber Antikörpern oder Antikörperfragmenten den Vorteil, daß sie oral applizierbar sind, selten immunologische Abstoßungsreaktionen hervorrufen und aufgrund ihres geringen Molekulargewichts die Blut-Hirn-Schranke leichter passieren können.

Besonders bevorzugt weisen diese niedermolekularen Agentien mehrere über Spacer miteinander verbundene Liganden auf, wobei die Liganden jeweils spezifisch an verschiedene nicht-überlappende, von den zuvor beanspruchten Antikörper-

pern erkannte Epitope schizophrenie-spezifischer Proteine binden. Solche Agentien werden auch als "composite molecules" bezeichnet und bieten vor allem den Vorteil, daß sie eine sehr viel höhere Affinität zu dem zu bindenden Protein aufweisen. So multipliziert sich z.B. die Affinität eines Moleküls zu dem zu bindenden Protein mit jedem hinzukommenden Liganden.

Eine letzte Variante sieht die Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen unter Verwendung von immunogenen Substanzen vor, die eine Immunantwort evozieren, dergestalt dass das Immunsystem des Patienten Antikörper gegen fehlgefaltete, z.B. schizophreniespezifische Proteine ausbildet.

Bei diesen Substanzen kann es sich z.B. um schizophreniespezifische Proteine oder Proteine, die spezifisch für andere neuropsychiatrische Erkrankungen, wie der Depression oder bipolar affektiven Erkrankung sind, handeln, wie sie mit einem der zuvor beanspruchten Aufreinigungsverfahren isoliert werden, oder deren rekombinant produzierten Äquivalente. Um diesen Proteinen ihre gegebenenfalls vorhandene Pathogenizität zu nehmen, ist es dabei unter Umständen erforderlich, sie vor der Applikation einer geeigneten Behandlung zu unterziehen. Ebenso kann es sich bei diesen Substanzen z.B. auch um Fragmente dieser über die zuvor beanspruchten Antikörper definierten, für Schizophrenie (oder ggf. Depression oder bipolare affektive Erkrankung) spezifischen Proteine handeln, die lediglich noch die immunogenen Bereiche enthalten, aber nicht mehr pathogen sind.

Die Erfindung soll im folgenden anhand von Beispielen verdeutlicht werden:

A: Isolierung fehlgefalteter Proteine

Verwendete Lösungen oder Puffer (sterilfiltriert):

VRL-Puffer: 50mM HEPES, pH 7,5, 250mM Sucrose, 5mM MgCl₂, 100mM KCH₃COO, 2mM PMSF, Proteaseinhibitor-Tabletten, "Complete EDTA-free"

(Roche 1873580)

High-Sucrose-Puffer: 50mM HEPES, pH 7,5, 1,6M Sucrose, 100mM KAc (KCH₃COO), 0,5% Triton-X-100, 1mM PMSF#

High-Salt-Puffer: 50mM HEPES, pH 7,5, 1M NaCl, 10mM MgCl₂, 100 U/ml DNase I

Sarkosyl-Puffer: 50mM HEPES, pH 7,5, 0,5% Sarkosyl

Weitere Puffer:

- A. 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 250 mM sucrose, 5 mM EDTA, 5 mM GSH, 1% NP-40, 0.2% sarkosyl.
- B. 50 mM HEPES pH 7.5, 1.5 M NaCl, 250 mM sucrose, 5 mM EDTA, 5 mM GSH, 1% NP-40.
- C. 50 mM Tris pH 8, 250 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 5 mM GSH, 1% NP-40.
- D. 50 mM HEPES pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 mM GSH, 1% NP-40.
- E. 50 mM HEPES pH 7.5, 2.3 M sucrose, 5 mM EDTA, 5 mM GSH, 1% NP-40. Adjust sucrose concentration using Puffer D.
- F. 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 250 mM sucrose, 5 mM EDTA, 5 mM GSH, 2x PIs.

Abkürzungen: Pis = protease inhibitor cocktail (Roche); PMSF = phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma), GSH = reduced glutathione (Sigma)

1. Protokoll "Herstellung der unlöslichen Proteinfraction (fehlgefaltetes Proteom) aus einem 10%igen Hirnhomogenat"

1. Es werden schockgefrorene Hirnproben der Hirnregionen BA8, BA9 und BA23, BA24 von verstorbenen Patienten, bei denen zu Lebzeiten eine Schizophrenie diagnostiziert wurde verwendet. BA8, BA9, BA23 und BA24 beziehen sich auf sogenannte Brodmannsche Areale und entsprechen bestimmten Neuroenzentren im Neokortex.

2. Gehirnprobe auf Trockeneis einwiegen und in entsprechendem Volumen VRL-Puffer homogenisieren. Aufbewahrung bei -80°C .
3. Homogenat auf Eis auftauen und mit 0,5% Triton-X-100 in 2ml-Mikroreaktionsgefäßen bei 20000g und 4°C 20 min zentrifugieren. Überstand sammeln und Pellet erneut im gleichen Volumen VRL-Puffer mit Triton resuspendieren.
4. Zweite Zentrifugation wie oben. Überstand zum ersten Überstand geben, davon 500µl separat bei -80°C aufbewahren.
5. Pellets in insgesamt 4ml High-Sucrose-Puffer lösen. Ultrazentrifugation in Ultra-Clear Centrifuge Tubes 5ml bei 130000g, 4°C , 45min (Beckmann MLS-50, 40000rpm) Überstand sammeln, überstehende Lipidschicht in separatem Mikroreaktionsgefäß einfrieren.
6. Pellet wieder in 4ml High-Sucrose-Puffer resuspendieren und erneut zentrifugieren wie oben. Überstand zum ersten Überstand geben. Aufbewahrung bei -20°C
7. Pellet in 4ml High-Salt-Puffer lösen, Inkubation über Nacht bei 4°C . Ultrazentrifugation in Ultra-Clear Centrifuge Tubes 5ml bei 130000g, 4°C , 45min (Beckmann MLS-50, 40000rpm). Überstand sammeln und Pellet erneut in High-Salt-Puffer (ohne DNase) resuspendieren. Falls erforderlich, Pellet dazu in einer Insulinspritze mit 0.6mm bis 0.4mm Kanüle aufnehmen.
8. Zweite Zentrifugation wie oben. Überstand zum ersten Überstand geben, davon 500µl separat bei -80°C aufbewahren. Aufbewahrung bei -20°C
9. Pellet in 200µl Sarkosyl-Puffer lösen. Dazu Pellet zunächst in 100µl Puffer mit der Pipettenspitze zerkleinern und in ein 0,5ml-Mikroreaktionsgefäß überführen. Gefäß und Pipettenspitze mit weiteren 100µl Sarkosyl-Puffer spülen und zu den ersten 100µl dazugeben. Mit Insulinspritze und 0.4mm Kanüle das Pellet lösen. Bei 4°C ca. 1 Stunde im Rotator inkubieren. Evtl. nach der Hälfte der Zeit erneut mit einer Insulinspritze homogenisieren.

10. Ultrazentrifugation in Mikroreaktionsgefäß (Beckmann 357448 Polyallomer Tubes with Snap-on Caps), deren Gewicht auf einer Analysenwaage bestimmt wurde, Bei 112000g, 4°C, 45min) (Beckmann TLA-55, 50000rpm). Überstand sammeln und erneut mit 200µl Sarkosyl-Puffer waschen. Resuspension und Zentrifugation wie oben.

11.Überstand sammeln und Gewicht der Pellets bestimmen. Aufbewahrung bei -80°C.

2. Protokoll "Herstellung der unlöslichen Proteinfraction (fehlgefaltetes Proteom) aus einem 10%igen Hirnhomogenat"

1. Das Hirnstück (z. B. 0.3-0.4 gr = 1 vol) bei 5 % (w/v) in Puffer A (plus 2x PIs, 1mM PMSF) homogenisieren und bei 1800 x g, 30 min, 4°C zentrifugieren. Das Pellet wird in Puffer A gewaschen und weiterverarbeitet (5 ml [15 vol] Waschvolumen).

2. Das Pellet in Puffer B suspendieren (10 ml [30 vol] Waschvolumen; zudem noch 1 mM PMSF und 0.2% Sarkosyl hinzugefügen), zentrifugieren (1800 x g, 30 min, 4°C) und einmal in Puffer B waschen (5 ml [15 vol] Waschvolumen).

3. Das Pellet wird anschliessend mit Puffer C gewaschen weiterverarbeitet (5 ml [15 vol] Waschvolumen). dann noch einmal gründlich resuspendiert in Puffer C (5 ml [15 vol] Waschvolumen; plus 2x PIs, 1 mM PMSF, Benzonase and DNaseI, 40 U/ml jeweils) und für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Anschliessend wird die gleiche Mischung über Nacht bei 4 °C geschüttelt und am nächsten Morgen zentrifugiert (1800 x g, 30 min, 4°C).

4. Das Pellet wird anschliessend in Puffer A (plus 1 mM PMSF, 5 ml [15 vol] Waschvolumen) gewaschen, zentrifugiert (1800 x g, 30 min, 4°C) und in Puffer D resuspendiert. Nach erfolgreicher Resuspension wird Sucrose dazugegeben so dass eine Sucroseendkonzentration von 1.6 M erreicht wird (70% der Sucrosekonzentration von Puffer E).

5. Die Suspension von 4) wird in einem 4:1 Verhältnis auf ein Kissen von 1 ml Puffer E gelegt und mit der Ultrazentrifuge bei 45.000 rpm im MLS-50 Rotor für 45 Minuten zentrifugiert (ungefähr 120.000 x g).
6. Die Interphase zwischen den Sucrosephasen wird abpipettiert (ungefähr 1 ml) und im Verhältnis 1:4 mit Puffer D verdünnt. Diese Suspension wird erneut auf 1 ml 70%igen Puffer E gelegt und zentrifugiert bei 45.000 rpm im MLS-50 Rotor für 45 Minuten zentrifugiert (ungefähr 120.000 x g). Das resultierende Pellet (0.1 ml) wird in Puffer F aufgenommen.
7. Das resultierende Pellet ("unlösliche Proteinfraction") wird anschliessend sowohl zur Immunisierung als auch für die Dot Blots und SDS-PAGE/Western blot verwendet.

Alle Schritte werden bei 4⁰C, bzw. auf Eis durchgeführt. Bei den Schritten 1.-4. wird in einer Tischzentrifuge bei 1800 x g, 30 Minuten bei 4 Grad Celsius zentrifugiert.

B: Herstellung von Antikörpern

a) Polyklonale Antikörper

Hühner, Kaninchen und Mäuse (BALB/c) werden mit ca. 500-1000 µg/100µl von vier Schizophreniepatienten gepoolten Pellets immunisiert. Dabei wurde dem (aggregierten) Antigen RIBI (Sigma) als Adjuvans zugegeben. Die Tiere werden dann zweimal im Abstand von 3 Wochen geboostet. Zwei Wochen nach der letzten Boosterung wird die Immunantwort untersucht. Bei Hühnern werden jeweils eine Woche nach der Boosterung, angefangen nach der ersten Boosterung, Eier gesammelt und aus dem Eigelb Antikörper (IgY) nach Standardmethoden isoliert.

b) Monoklonale Antikörper

Für die Gewinnung monoklonaler Antikörper wird wie beschrieben ein geeignetes Tier immunisiert, und dann in bekannter Weise (G Köhler, C Milstein 1975, *Continuos cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature*, 256, 495-497) antikörperproduzierende Zellen (z.B. B-Zellen der Milz) aus dem immunisierten Tier entnommen, mit immortalisierten Myelomzellen fusioniert und selektioniert. Die erhaltenen Hybridomazellen werden dann in Hinblick auf die Spezifität der von ihnen produzierten Antikörper gegen das fehlgefaltete Protein ausgewählt.

Die monoklonalen Antikörper 7B2 und 9C9 wurden wie folgt hergestellt:

Unlösliche, fehlgefaltete Proteine gereinigt aus gefrorenen Hirnstücken (Kortex, BA8) von 15 Patienten mit Schizophrenie wurden gepoolt und in Prionprotein (PrP) knockout Mäuse zur Immunisierung unter Verwendung von RIBI als Adjuvant subkutan injiziert. PrP knockout Mäuse wurden verwendet, da diese bereits erfolgreich zum Erzeugen von konformationsspezifischen monoklonalen Antikörpern verwendet wurden und in dieser Erfindung auch bevorzugt für die Erzeugung von konformationsspezifischen mABs gegen andere Antigene als PrP verwendet werden. Die Mäuse wurden zweimal geboostert, nach jeweils drei Wochen Abstand; zehn Tage nach dem letzten Booster wurden die Mäuse an zwei aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal geboostert und am dritten Tag die Milz zur Fusion entnommen. Die Fusion der Milzzellen (Splenozyten) mit den Myelomzellen zu resultierenden Hybridomzellen erfolgte nach Standardmethoden.

C: Immunologische Charakterisierung

Generell wurden mit den gewonnenen Antikörpern Hirnhomogenate normaler, schizophrener, depressiver, und bipolar affektiv erkrankter Patienten per Western Blot bzw. DotBlot untersucht.

Die Ergebnisse sind in den Figuren wiedergegeben.

Dabei zeigt:

Fig. 1: einen Western blot von biochemisch fraktioniertem Pellet oder 1. Überstand (nach Sarkosylinkubation) von Hirnhomogenaten Normaler oder Schizophrener Patienten nach biochemischer Fraktionierung auf schwer lösliche, sarkosylresistente Proteinaggregate (Antikörper: Hühner-IgY).

S = 1. Überstand, P = Pellet; N1 - N4 = Hirn gesunder Personen, S1 - S4 = Hirn von Schizophrenie-Patienten. Die Pfeile (p85ch, p58ch, p20ch) beziehen sich auf immunoreaktive Banden, die spezifisch nur bei Schizophreniepatienten auftreten, und somit biologische Marker darstellen. Die Pfeile auf der linken Seiten geben Molekulargewichte an.

Fig. 2: einen Western blot von biochemisch fraktioniertem Pellet oder 1. Überstand von Hirnhomogenaten Normaler oder Schizophrener Patienten nach biochemischer Fraktionierung auf schwer lösliche, sarkosylresistente Proteinaggregate. (Antikörper: Mausserum).

S= 1. Überstand, P= Pellet; N1 - N4 = Hirn gesunder Personen, S1 - S4 = Hirn von Schizophrenie-Patienten. Die Pfeile beziehen sich auf immunoreaktive Banden, die spezifisch nur bei Schizophreniepatienten auftreten, und somit biologi-

sche Marker darstellen (p55mo, p35mo). Die Pfeile auf der linken Seite geben Molekulargewichte an.;

Fig. 3a: einen Dotblot mit monoklonalem Antikörper RC1 unter nicht denaturierenden Bedingungen von einem Pool von Sarkosyl-resistentem Pellet (Fraktion X) von gepooltem Normalhirn (N; BA9) und gepooltem Schizophreniehirn (S; BA9).

Als Antikörper wurde der monoklonale konformationsspezifische Antikörper RC1 verwendet, der die native Oberflächenstruktur eines Proteins, das spezifisch bei Schizophrenie vorhanden ist, mit hoher Konformationsspezifität erkennt;

Fig. 3b: Dot Blot Assay mit monoklonalen Antikörpern 7B2 und 9C9.

Die monoklonalen Antikörper 7B2 und 9C9 wurden nach folgendem Screening erhalten und getestet: Die Zellkulturüberstände von ca. 3000 Hybridomzellen wurden mit einem Dotblotassay in einem speziellen Apparat (ELIFA Apparat; Pierce, USA) im 96 Wellformat gescreent. Hierbei wurden parallel gleiche Mengen der gepoolten unlöslichen Proteine (aufgereinigt nach Protokoll 1) von Patienten mit Schizophrenie und Normalpersonen auf Nitrozellulose aufgetragen, die Membran wurde geblockt mit 5% non-fat dry milk in TBST (Tris-gepufferte Salzlösungen enthaltend Tween) und die Zellkulturüberstände in den Wells des ELIFA-Apparats auf den Dots für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde gewaschen und mit einem Zweitantikörper (anti-mouse IgG/M), an den kovalent Peroxidase gekoppelt ist für eine Stunde inkubiert. Der Blot wurde anschliessend gewaschen, mit ECL Substrat versetzt, und auf Hyperfilm (Amersham) entwickelt. Die Ergebnisse zeigt Fig. 3b. Von denjenigen Überständen, die sehr viel stärker oder ausschliesslich mit den unlöslichen Proteinen der Schizophreniehirne reagieren (schwarz), wurden die Hybridomzellen gepickt und mehrfach subkloniert. Anschliessend wurde in grösseren Mengen Überstand in

serumfreiem Medium (PFHM; Gibco, USA) produziert, das dann für anschließende Untersuchungen verwendet wurde. Als besonders geeignet erwiesen sich zwei Antikörper, die mit 7B2 und 9C9 bezeichnet wurden.

Fig. 4: einen Western blot von biochemisch fraktioniertem Pellet von Hirnhomogenaten Normaler oder Schizophrener Patienten.

Die Homogenate wurden nach dem 1. Protokoll aufgereinigt. Antikörper stammen aus Maus-Antiserum. P = Pellet; N1 - N4 = Hirn gesunder Personen, S1 - S4 = Hirn von Schizophrenie-Patienten. Die Pfeile beziehen sich auf immunoreaktive Banden, die spezifisch nur bei Schizophreniepatienten auftreten, und somit biologische Marker darstellen (p45mo2, p37mo2); Antikörper: Mausserum

Fig. 5: a) einen Western blot von biochemisch fraktioniertem Pellet von Hirnhomogenaten Normaler oder Schizophrener Patienten.

Die Homogenate wurden nach dem 1. Protokoll aufgereinigt. Als Antikörper wurde der monoklonale AK SX16.3 verwendet. P = Pellet; N1 - N4 = Hirn gesunder Personen, S1 - S4 = Hirn von Schizophrenie-Patienten. Die Pfeile beziehen sich auf immunoreaktive Banden, die spezifisch nur bei Schizophreniepatienten auftreten, und somit biologische Marker darstellen (p37, p-stack). p-stack ist eine Immunoreaktivität aus dem Well. Es handelt sich hierbei um unlösliche Proteine, die beim Beschicken des Gels mit aufgenommen wurden, aber aufgrund ihrer Unlöslichkeit nicht im Gel transportiert wurden. Ein Teil von p-stack ist in Lösung gegangen und bildet p37;

Fig. 5 b.: :Einen Western blot von biochemisch fraktioniertem Pellet von Hirnhomogenaten Normaler oder Schizophrener Patienten aus der Region BA9.

Die Homogenate wurden nach dem 1. Protokoll aufgereinigt. Als Antikörper wurde der monoklonale AK 7B2 verwendet. P = Pellet; N1 - N4 = Hirn gesunder Personen, S1 - S4 = Hirn von Schizophrenie-Patienten. Es ist zu sehen, dass AK 7B2 nur Immunoreaktivität bei Schizophreniehirnen zeigt.

Fig. 6: Western blot von biochemisch fraktioniertem Pellet bzw. dem 1. Überstand von Hirnhomogenaten Normaler oder Schizophrener Patienten.

Die Homogenate wurden nach dem 1. Protokoll aufgereinigt. Antikörper stammen aus Kaninchen-Antiserum. S = 1.Überstand, P = Pellet; N1 - N4 = Hirn gesunder Personen, S1 - S4 = Hirn von Schizophrenie-Patienten. Obwohl es keine immunoreaktiven Banden gibt, die ausschliesslich bei Schizophrenen, aber nicht bei gesunden Personen auftreten, ist deutlich zu sehen, dass im Bereich der markierten Rechtecke nur bei Schizophrenen Immunoreaktivität vorhanden ist. Das bedeutet, dass in dem molekularen Bereich unterhalb von 60kD ausschliesslich bei Schizophrenen unlösliche Proteine pelletieren;

Fig. 7: Western blot von biochemisch fraktioniertem Pellet bzw. dem 1. Überstand von Hirnhomogenaten Normaler oder Schizophrener Patienten.

Die Homogenate wurden nach dem 1. Protokoll aufgereinigt. Als Antikörper wurde der monoklonale Antikörper: MW1, verwendet, der Polyglutamin-haltige ("polyQ") Epitope erkennt [Ko et al., 2001, Brain Research Bulletin 56:319f] S = 1.Überstand, P = Pellet; N1 - N4 = Hirn gesunder Personen, S1 - S4 = Hirn von Schizophrenie-Patienten. BA9 und BA24 bezeichnen verschiedene Hirnregionen

nach Brodman. Man erkennt Polyglutamin-haltige Banden am oberen Rand des Gels, bei denen es sich um im Well pelettierte, SDS-resistente, polyglutamin-Multimere handelt, die beim Beschicken des Gels mit aufgenommen wurden, aber aufgrund ihrer relativen Unlöslichkeit nicht im Gel transportiert wurden. Es ist jedoch kein Unterschied zwischen Normalen und Schizophrenie-Patienten festzustellen. Es liegt also ein Hinweis dafür vor, daß Polyglutamin-haltige Proteine nicht Schizophrenie-spezifisch sind.

Fig. 8: Western Blot mit 7B2 und 9C9 gegen unlösliche Proteinfractionen B8 der SMRI Consortium Collection (SMRI).

Die monoklonalen Antikörper 7B2 und 9C9 wurden gegen die unlöslichen Proteinfractionen von BA8 Hirnhomogenaten von Patienten mit Schizophrenie (dieselben, die zum Immunisieren genommen worden waren), Depression, Bipolar disorder, und Normalkontrollen auf dem Western blot (WB) getestet. Die Ergebnisse zeigt Fig. 8. Die unlösliche Proteinfraction der einzelnen Hirne wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im WB dargestellt. Die Bewertung erfolgte blind, d.h. ohne dass die oben angegebenen Diagnosen der einzelnen Hirne bekannt waren. Positiv bewertet wurden nur solche Banden, die ausreichende Immunreaktivität besaßen.

Für mAB 9C9 ergab sich nach statistischer Auswertung mittels crosstabs / Pearson Chi-Square Analyse, dass die als positiv bewerteten immunoreaktiven Banden folgendes erkannten: 2 (von 15) Normalkontrollen; 5 (von 15) Depressive, 7 (von 15) Bipolare, und 7 (von 15) Schizophrene. Damit ergab sich eine signifikante Erkennung von 9C9 von krank vs. normal ($p=0.042$), schizophren vs. normal ($p=0.046$), und bipolar vs. normal ($p=0.046$). Die statistische Analyse wurde mit SPSS (version 11.0 auf Apple G4) durchgeführt.

Für mAB 7B2 ergab sich nach statistischer Auswertung mittels crosstabs / Pearson Chi-Square Analyse, dass die als positiv bewerteten immunoreaktiven Banden folgendes erkannten: 2 (von 15) Normalkontrollen; 6 (von 15) Depressive, 5 (von 15) Bipolare, und 7 (von 15) Schizophrene. Damit ergab sich eine signifikante Erkennung von 7B2 von schizophren vs. normal ($p=0.046$), aber nicht bipolar vs. normal ($p=0.195$) oder krank vs. normal ($p=0.058$). Die statistische Analyse wurde mit SPSS (version 11.0 auf Apple G4) durchgeführt.

Fig. 9: Western Blot von 7B2 gegen unlösliche Proteinfractionen von BA23 (SMRI)

Weiterhin wurde 7B2 gegen die unlöslichen Proteinfractionen von BA23 Hirnhomogenaten, also einer anderen Hirnregion, von Patienten mit Schizophrenie, Depression, Bipolar disorder, und Normalkontrollen auf dem Western blot getestet (Bild 3). Positiv bewertet wurden nur solche Banden, die ausreichende Immunreaktivität besaßen und insbesondere die zweite, etwas kleinere Bande einschlossen.

Für mAB 7B2 ergab sich nach statistischer Auswertung mittels crosstabs / Pearson Chi-Square Analyse, dass die als positiv bewerteten immunoreaktiven Banden folgendes erkannten: 4 (von 15) Normalkontrollen; 9 (von 15) Depressive, 10 (von 15) Bipolare, 4 (von 15) Schizophrene. Damit ergab sich eine signifikante Erkennung von 7B2 von bipolar vs. normal ($p=0.028$), aber nicht von Schizophrenie vs. normal ($p=1$) oder krank vs. normal ($p=0.09$). Die statistische Analyse wurde mit SPSS (version 11.0 auf Apple G4) durchgeführt.

Im Vergleich der Daten aus Fig. 8 und Fig. 9 zeigt sich also, dass das 7B2 Antigen zwar in der BA8 Region (präfrontaler Cortex) unlöslich ist, und hier auch Schizophrenie-Hirne von Normalhirnen unterscheiden kann, dass dies für eine andere Hirnregion (BA23, hinteres Cingulum) nicht zutrifft. Hier kann 7B2 nicht

mehr Schizophrenie-Hirne von Normalhirnen unterscheiden, dafür aber Bipolar-Hirne von Normalhirnen, was er wiederum in der BA8 Region nicht konnte.

Diese Ergebnisse spiegeln die Tatsache wieder, dass es in der biologischen Ursache der Schizophrenie und der Bipolar Disorder Überlappungen gibt, die sich in der unterschiedlichen Löslichkeit des 7B2 Antigens in verschiedenen Hirnregionen zeigen. Diese Unterschiede können ihre Ursache in unterschiedlicher Präsenz von bestimmten Zelltypen oder eines bestimmten extrazellulären Milieus haben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mAB 7B2 und 9C9 zur spezifischen Erkennung neuropsychiatrischer Erkrankungen, speziell der Schizophrenie, der Bipolaren Störung, und der Depression anhand von Hirnhomogenaten geeignet sind.

Hinterlegung von biologischem Material:

Hybridomazellen, die die Antikörper 7B2 und 9C9 produzieren wurden gemäß Budapester Vertrag bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D38124 Braunschweig wie folgt hinterlegt:

1. Hybridomazellen (Antikörper 7B2): DSM ACC2713, Hinterlegungsdatum: 26.01.2005.
2. Hybridomazellen (Antikörper 9C9): DSM ACC2714, Hinterlegungsdatum: 26.01.2005.

Aktenzeichen des Anmelders o 03705pct	nwalts	Internationales Aktenzeichen PCT/EP2005/001371
--	--------	---

**ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS
ODER ANDEREM BIOLOGISCHEN MATERIAL**

(Regel 13bis PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den hinterlegten Mikroorganismus oder anderes biologisches Material, das in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>28</u> Zeile <u>7ff</u>	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG	
Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name der Hinterlegungsstelle Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig Deutschland	
Datum der Hinterlegung 26/01/2005	Eingangsnummer DSM ACC2713
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)	
Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/>	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte freilassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z.B. „Eingangsnummer der Hinterlegung“)	

Vom Anmeldeamt auszufüllen	Vom Internationalen Büro auszufüllen
<input checked="" type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung	<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter Orie/na laa/poni	Bevollmächtigter Bediensteter

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONALES FORMBLATT

Institut für Neuropathologie
Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: 7B2	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM ACC2713
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(X) eine wissenschaftliche Beschreibung () eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2005-01-26 (Datum der Erst- hinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weh</i></p> <p>Datum: 2005-02-03</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Institut für Neuropathologie
Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Institut für Neuropathologie Heinrich Heine Universität Düsseldorf Anschrift: Moorenstr. 5 40225 Düsseldorf	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2713 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2005-01-26
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2 geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ⁴	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: Datum: 2005-02-03

- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehene Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

Aktenzeichen des Anmelders (nwalts 03705pct	Internationales Aktenzeichen PCT/EP2005/001371
--	---

**ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS
ODER ANDEREM BIOLOGISCHEN MATERIAL**

(Regel 13bis PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den hinterlegten Mikroorganismus oder anderes biologisches Material, das in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>28</u> Zeile <u>7ff</u>	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input type="checkbox"/>	
Name der Hinterlegungsstelle Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig Deutschland	
Datum der Hinterlegung 26/01/2005	Eingangsnummer DSM ACC2714
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/>	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte freilassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z.B. „Eingangsnummer der Hinterlegung“)	

Vom Anmeldeamt auszufüllen
<input checked="" type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung
Bevollmächtigter Bediensteter Ornelina Iacoponi

Vom Internationalen Büro auszufüllen
<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Institut für Neuropathologie
Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: 9C9	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2714
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2005-01-26 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am _____ eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am _____ eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: Datum: 2005-02-03

¹ Falls P. 15.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Institut für Neuropathologie
Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Institut für Neuropathologie Heinrich Heine Universität Düsseldorf Anschrift: Moorenstr. 5 40225 Düsseldorf	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2714 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2005-01-26
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> ³ lebensfähig <input type="checkbox"/> ³ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ⁴	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: Datum: 2005-02-03

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehene Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

Antikörper zur Diagnose und Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen, insbesondere von Schizophrenie, Depression und bipolaren affektiven Störungen.

Patentansprüche:

1. Antikörper für die Diagnose oder die Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper fehlgefaltete Proteine erkennt, die sich spezifisch einer der Erkrankungen zuordnen lassen.
2. Antikörper gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei der Erkrankung um Schizophrenie handelt.
3. Antikörper gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei der Erkrankung um Depression handelt.
4. Antikörper gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei der Erkrankung um eine bipolare affektive Erkrankung handelt.
5. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1-4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper fehlgefaltete Proteine erkennt, die spezifisch für mehrere Erkrankungen sind, wobei die Zuordnung zu einer Erkrankung anhand

von weiteren Eigenschaften des Proteins und/oder seiner Herkunft möglich ist.

6. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass er durch Immunisierung von geeigneten Tieren mit aufgereinigten Hirnfraktionen von Patienten mit einer neuropsychiatrischen Erkrankung gewonnen wird, wobei während der Aufreinigung Schritte vorgesehen sind, die eine Anreicherung von fehlgefalteten Proteinen bewirken.
7. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass während der Aufreinigung ein Reinigungsschritt mit ionischen Detergenzien vorgesehen ist.
8. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Reinigungsschritt bei 0 – 10 °C durchgeführt wird.
9. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass das während des Reinigungsschritts verwendete ionische Detergens in einer Konzentration zwischen 0.2 und 2 % eingesetzt wird.
10. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass das während des Reinigungsschritts verwendete ionische Detergens Sarkosyl ist.
11. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Reinigungsschritt mit einem ionischen Detergens einen Ultrazentrifugationsschritt bei mindestens 100 000 x g umfaßt.

12. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass während der Aufreinigung ein Reinigungsschritt mit ggf. immobilisierten, β -Faltblatt-bindenden Substanzen wie Kongorot, Thioflavin oder β -Faltblatt-bindenden Peptiden vorgesehen ist.
13. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass während der Aufreinigung ein Protease-Verdauungsschritt bei einer Temperatur von 0 – 10 °C vorgesehen ist.
14. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
15. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper ein konformations-spezifischer monoklonaler Antikörper ist.
16. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper ein rekombinanter Antikörper ist.
17. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper ein hirngängiger Antikörper ist.
18. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper ein chimärer oder humanisierter Antikörper ist.
19. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper ein Antikörperfragment ist.

20. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper an eine pharmazeutisch aktive Substanz gekoppelt ist.
21. Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper an ein Isotop oder ein radioaktiv markiertes Molekül gekoppelt ist.
22. Antikörper mit der Bezeichnung 7B2, der mit Hybridomazellen produzierbar ist, die unter der Nummer DSM ACC2713 hinterlegt sind, zur Diagnose oder Behandlung von Erkrankungen, insbesondere von neuropsychiatrischen Erkrankungen gemäß einem der Ansprüche 1 - 4.
23. Antikörper mit der Bezeichnung 9C9, der mit Hybridomazellen produzierbar ist, die unter der Nummer DSM ACC2714 hinterlegt sind, zur Diagnose oder Behandlung von Erkrankungen, insbesondere von neuropsychiatrischen Erkrankungen gemäß einem der Ansprüche 1 - 4.
24. Verfahren zur Diagnose von neuropsychiatrischen Erkrankungen gemäß Anspruch 1-4 mittels Antikörpern, die an für neuropsychiatrische Erkrankungen spezifische Proteine binden, bei dem
 - a) die Antikörper mit einer Gewebe- oder Körperflüssigkeitsprobe eines Patienten in Kontakt gebracht werden,
 - b) gegebenenfalls gebildete Antikörper-Proteinkomplexe nachgewiesen werden, und
 - c) das eventuelle Vorhandensein von Antikörper-Proteinkomplexen als positiver Befund für eine neuropsychiatrische Erkrankung gewertet wird,**dadurch gekennzeichnet**, dass

- d) bei dem Verfahren ein Antikörper nach einem der Ansprüche 1 - 23 verwendet wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorhandensein von Antikörper-Proteinkomplexen mittels ELISA, Western-Blot oder immungekoppelter Fluoreszenzmethoden nachgewiesen wird.
26. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 oder 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass der positive Befund für eine neuropsychiatrische Erkrankung eine diagnostizierte Prädisposition und/oder eine positive Diagnose für eine der Erkrankungen nach einem der Ansprüche 1 - 4 ist.
27. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 - 26, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zu untersuchende Körperflüssigkeitsprobe Liquor, Urin, Blut oder Serum ist.
28. Verwendung von Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 - 24 zur Herstellung einer einem Patienten insbesondere in hirngängiger Form applizierbaren pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen gemäß einem der Ansprüche 1 - 4.
29. Verwendung nach Anspruch 28, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Antikörper mit pharmazeutisch aktiven Substanzen gekoppelt sind.
30. Verwendung nach Anspruch 28, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Antikörper mit Isotopen oder radioaktiv markierten Molekülen gekoppelt sind.
31. Verwendung von dem Patienten applizierbaren, niedermolekulare, hirngängigen Agentien zur Herstellung einer einem Patienten in hirngängiger Form

applizierbaren pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen gemäß einem der Ansprüche 2 - 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Agentien die gleichen Oberflächenstrukturen erkennen wie die Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 - 21.

32. Verwendung nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, dass die niedermolekularen Agentien organische Moleküle sind, die spezifisch an von Antikörpern gemäß einem der Ansprüche 1 - 24 erkannte Epitope binden.
33. Verwendung nach einem der Ansprüche 31 oder 32, bei dem die Agentien mehrere über Spacer miteinander verbundene Liganden aufweisen, die jeweils spezifisch an verschiedene nicht-überlappende, von Antikörpern gemäß einem der Ansprüche 1 - 24 erkannte Epitope binden.
34. Verwendung von immunogenen Substanzen, die eine Immunantwort dergestalt evozieren, dass das Immunsystem eines Patienten Antikörper gegen fehlgefaltete Proteine gemäß Anspruch 1 ausbildet, zur Herstellung einer einem Patienten in hirngängiger Form applizierbaren pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen gemäß einem der Ansprüche 1 - 4.
35. Verwendung gemäß Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den immunogenen Substanzen um fehlgefaltete Proteine oder Fragmente sind, die sich einer der Erkrankungen gemäß der Ansprüche 1 - 4 zuordnen lassen.

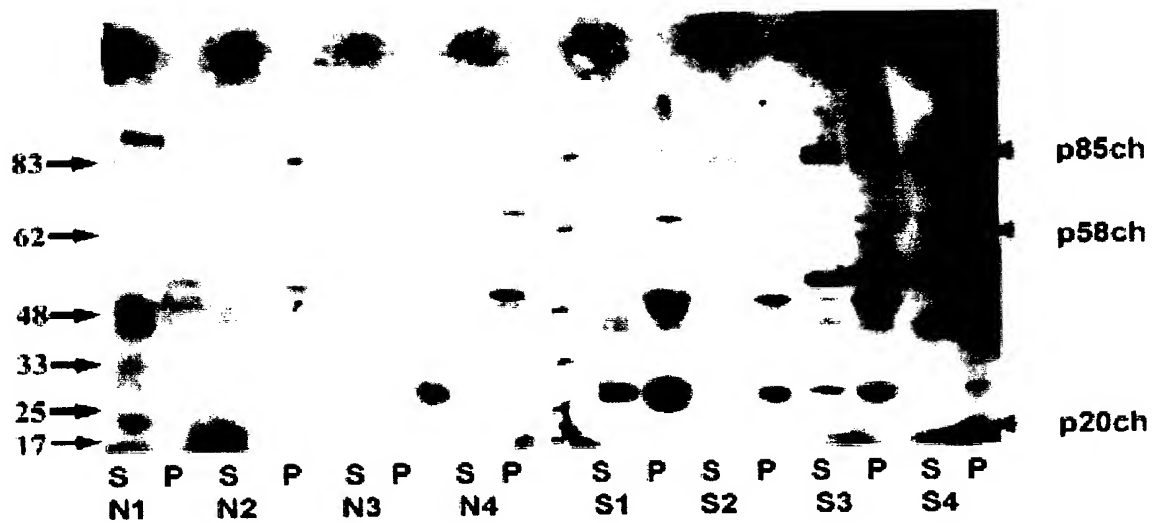


Fig. 1

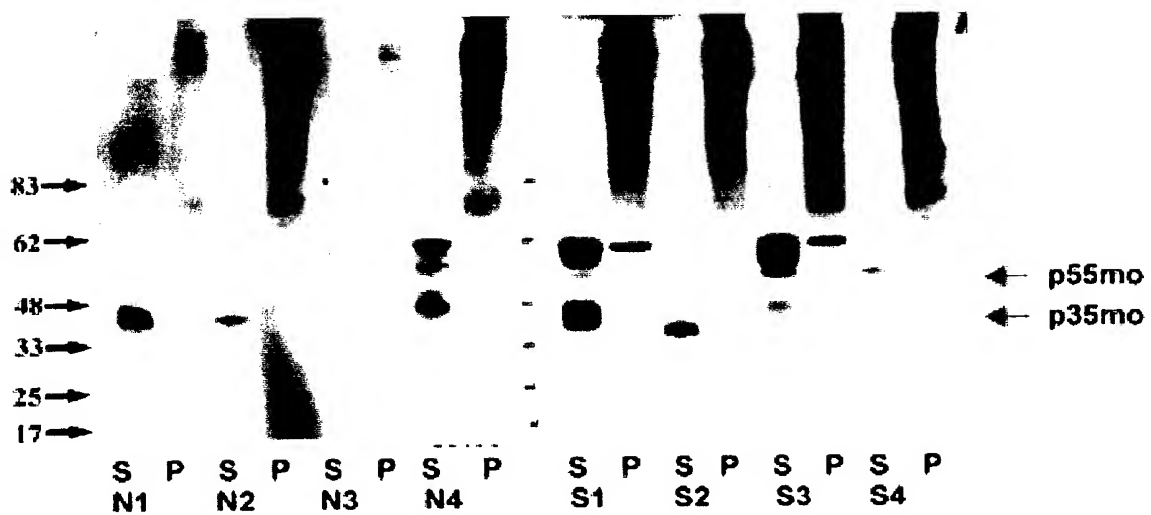


Fig. 2

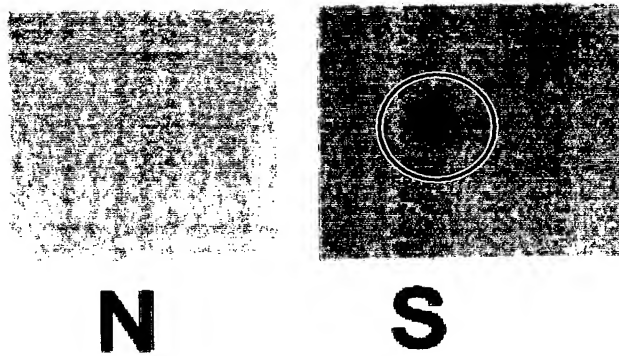


Fig. 3a

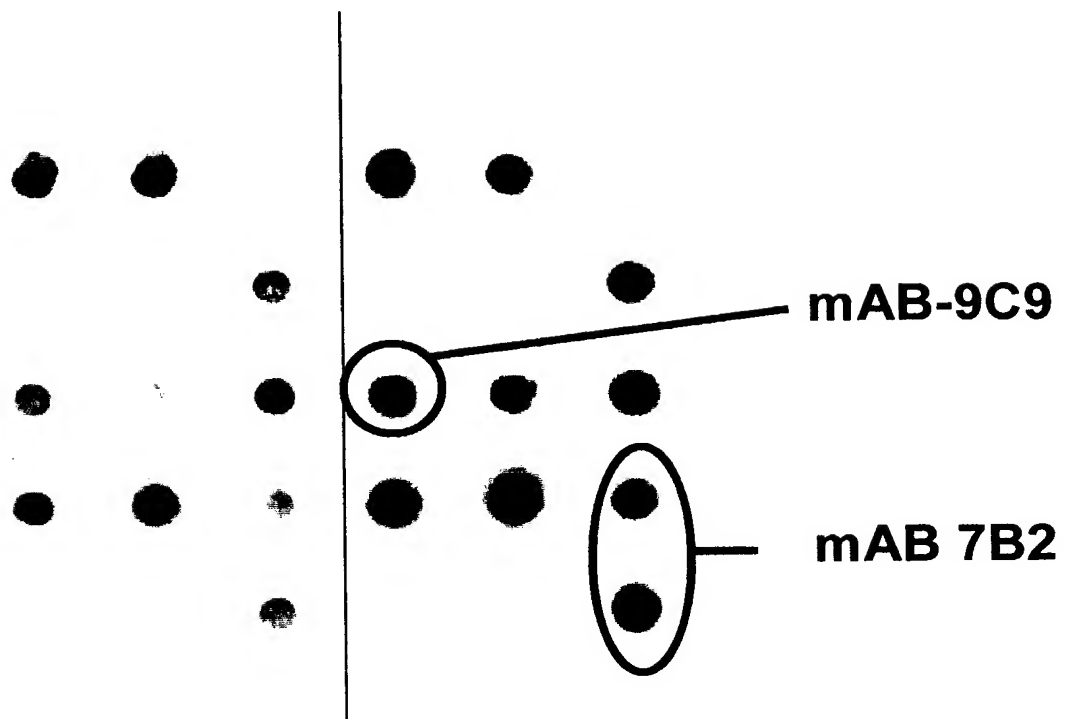


Fig. 3b

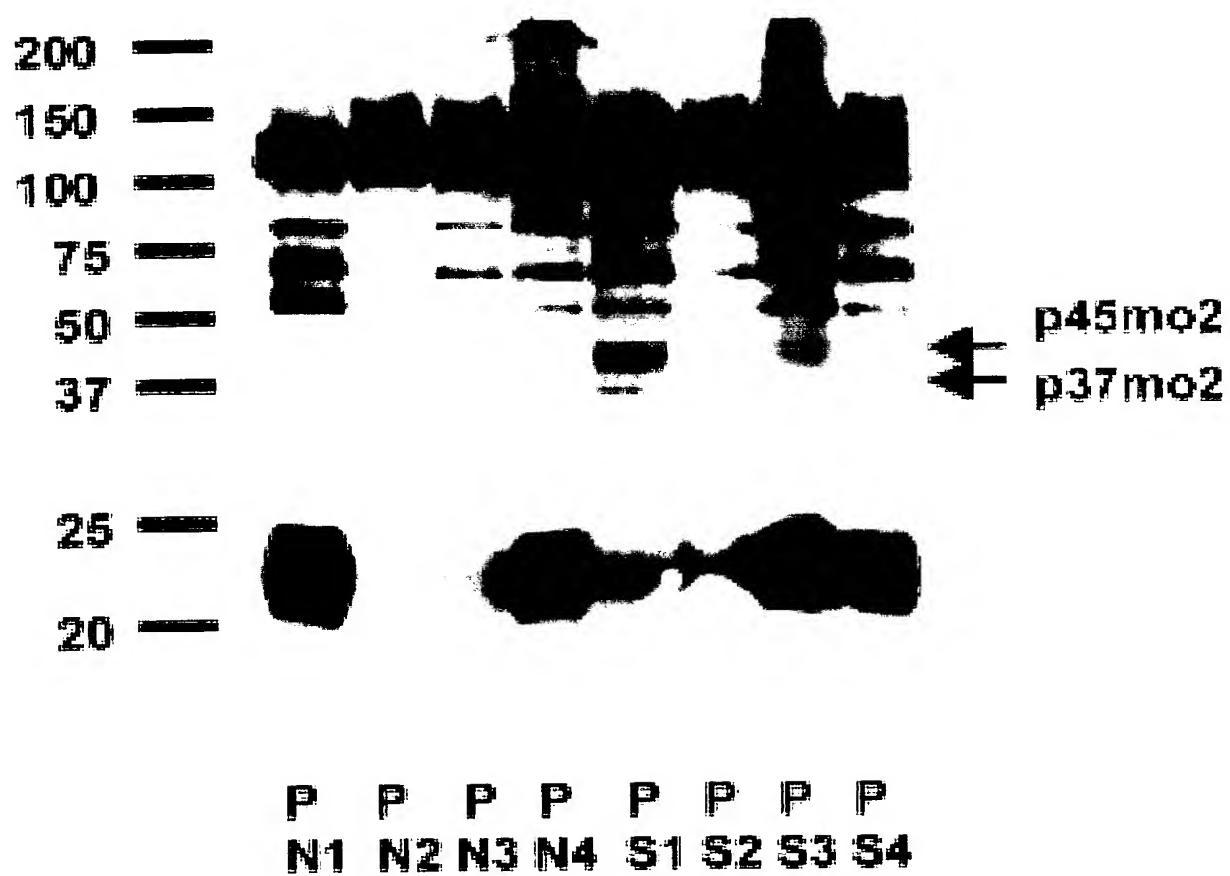


Fig. 4

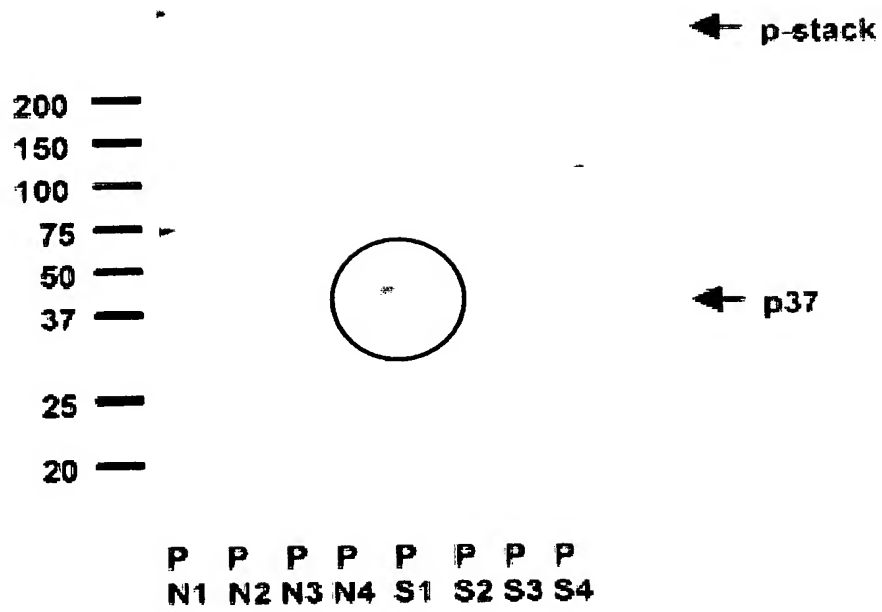


Fig. 5a

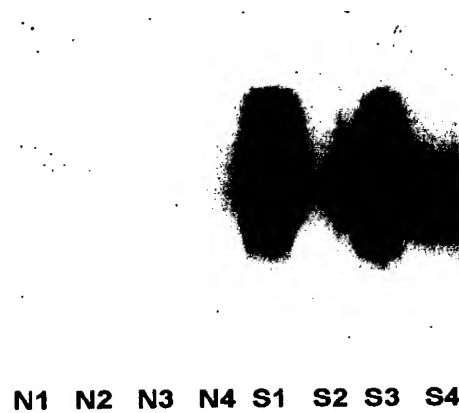


Fig. 5b

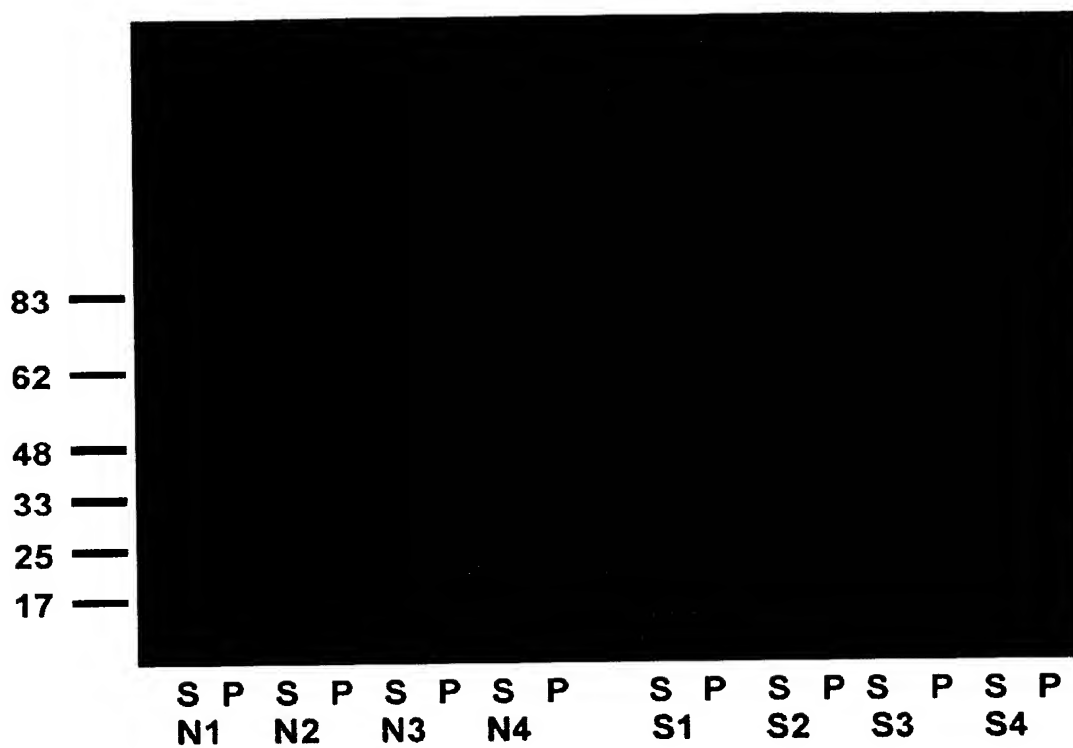


Fig. 6

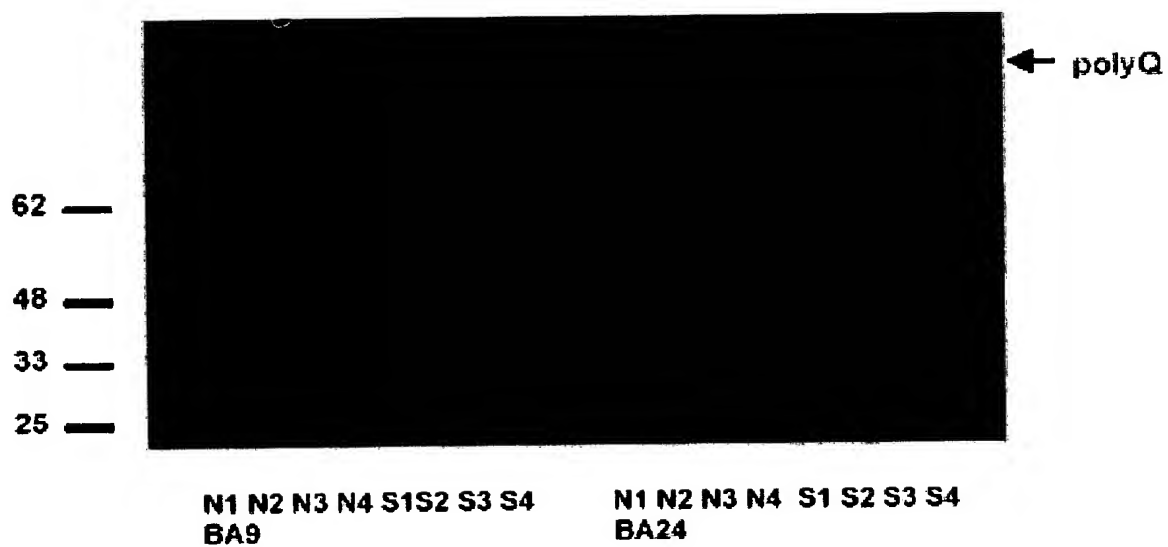


Fig. 7

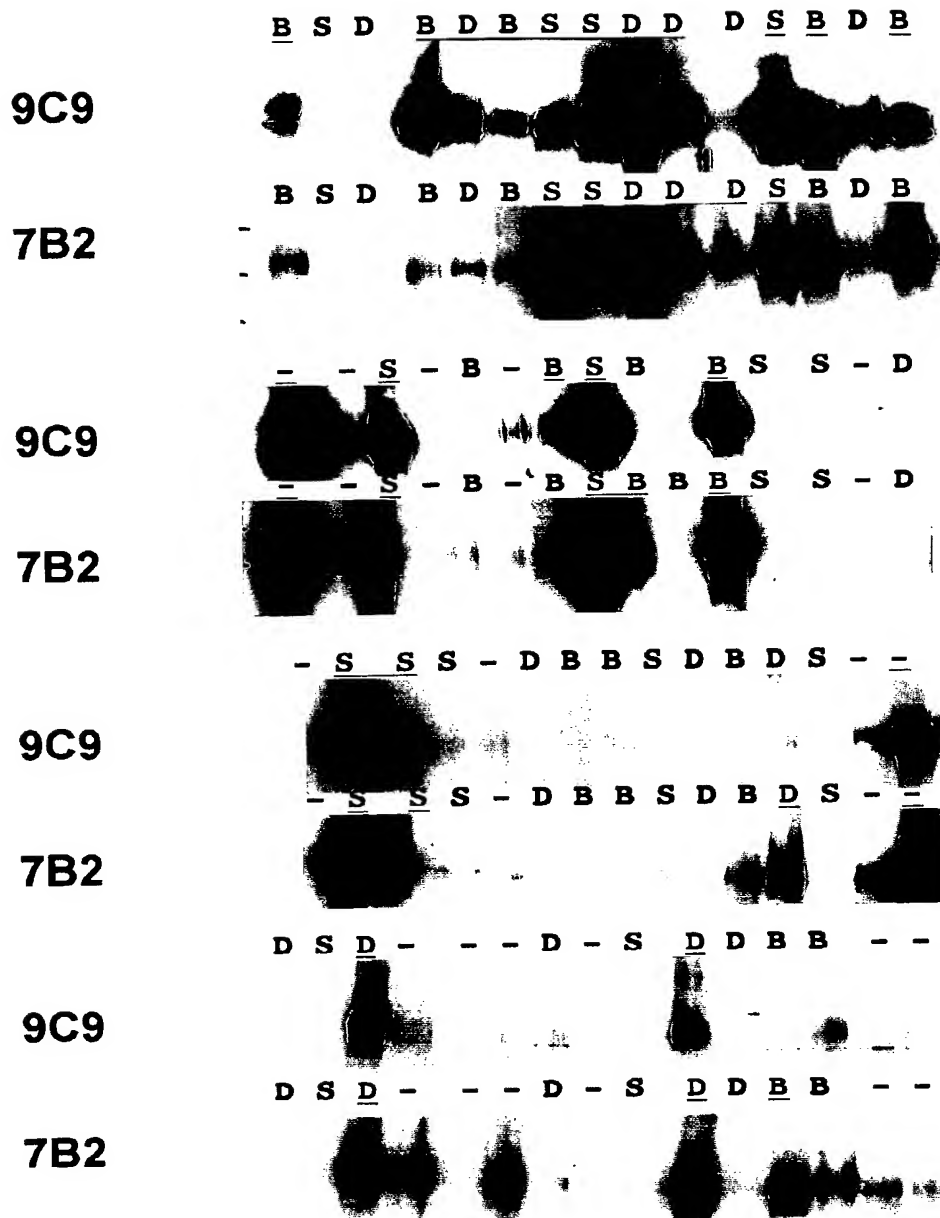


Fig. 8

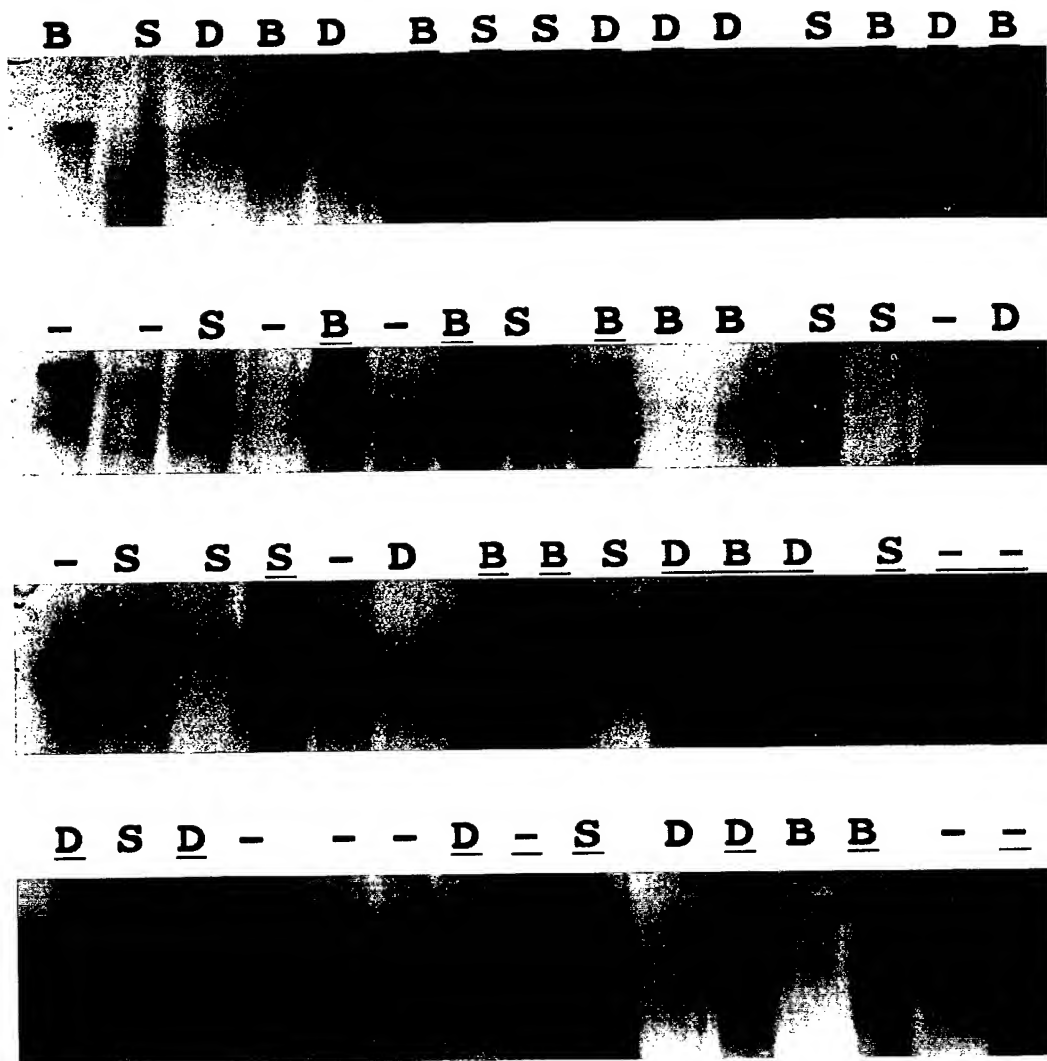


Fig. 9